

Bài báo nghiên cứu

SỰ TÍCH LŨY CAROTENOID VÀ LIPID CỦA VI TẢO *DUNALIELLA BARDAWIL* DCCBC 15 NUÔI CẤY Ở ĐIỀU KIỆN ỨC CHẾ NỒNG ĐỘ MUỐI CAO

Võ Hồng Trung*, Nguyễn Huỳnh Nhi, Nguyễn Thị Hồng Phúc

Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Việt Nam

*Tác giả liên hệ: Võ Hồng Trung – Email: vhtrung@ntt.edu.vn

Ngày nhận bài: 17-10-2022; ngày nhận bài sửa: 19-4-2023; ngày duyệt đăng: 22-4-2023

TÓM TẮT

Vi tảo lục đơn bào chịu mặn *Dunaliella bardawil* (*D. salina* var *bardawil*) là nguồn cung cấp β -caroten tự nhiên, hàm lượng β -caroten đạt đến 14% trọng lượng khô trong điều kiện nuôi cấy bất lợi như cạn kiệt dinh dưỡng, độ muối cao, ánh sáng cao. Nghiên cứu này nhằm đánh giá khả năng tích lũy carotenoid và lipid của vi tảo *Dunaliella bardawil* DCCBC 15 ở các điều kiện cạn kiệt dinh dưỡng, độ muối 3M và 4,5M trên môi trường MD4. Kết quả cho thấy, hàm lượng carotenoid của *D. bardawil* nuôi cấy ở điều kiện cạn kiệt dinh dưỡng (14,890 pg/tb) và tỉ lệ car/dlt (7,966) cao hơn các điều kiện ỨC CHẾ ĐỘ MUỐI 3,0M (12,710 pg/tb và 7,269) và 4,5M (11,526 pg/tb và 7,258) ($p < 0,05$). Tương tự, sự tích lũy lipid của *D. bardawil* ở điều kiện cạn kiệt dinh dưỡng (145,946 pg/tb) và tỉ lệ lipid/dlt (77,964) cao hơn so với điều kiện muối 3M (122,038 pg/tb và 71,376) và 4,5M (122,963 pg/tb và 77,612). Như vậy, điều kiện nuôi cấy cạn kiệt dinh dưỡng là một chiến lược nuôi cấy *D. bardawil* để thu nhận sinh khối có hàm lượng carotenoid và lipid cao.

Từ khóa: carotenoid; *Dunaliella bardawil*; lipid; cạn kiệt dinh dưỡng; ỨC CHẾ ĐỘ MUỐI CAO

1. Giới thiệu

β -caroten là sắc tố tiền vitamin A phổ biến nhất ở người (Chavoshi & Shariati, 2019; Paniagua-Michel, Olmos-Soto, & Ruiz, 2012; Shete & Quadro, 2013). Vi tảo *Dunaliella salina* var. *bardawil* (*D. bardawil*), là nguồn cung cấp β -caroten tự nhiên dồi dào nhất (chiếm 14% trọng lượng khô). Các carotenoid từ *D. salina* được dùng trong thực phẩm chăn nuôi, dược phẩm, dinh dưỡng và mỹ phẩm (Ravishankar & Rao, 2019). Hơn nữa, *D. salina* còn là nguồn cung cấp lipid có tiềm năng lớn trong sản xuất nhiên liệu sinh học (Goswami, Agrawal, & Verma, 2021).

Trong điều kiện môi trường bất lợi, như cạn kiệt dinh dưỡng, bức xạ cao, stress thẩm thấu hoặc nồng độ muối cao, tế bào *D. salina* và *D. bardawil* tích tụ nhiều carotenoid và glycerol (Ben-Amotz, Katz, & Avron, 1982; Ramos et al., 2011). Ở *D. salina*, β -caroten được tích lũy trong các giọt nằm ở khoảng gian bào giữa các thylakoid trong lục lạp. Beta-

Cite this article as: Vo Hong Trung, Nguyen Huynh Nhi, & Nguyen Thi Hong Phuc (2023). Accumulation of carotenoid and lipid in microalgae *Dunaliella bardawil* DCCBC 15 cultivated under high salinity conditions. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 20(4), 727-737.

caroten xuất hiện dưới dạng một số đồng phân, hai trong số đó là 9-cis và all-trans, chiếm khoảng 80% tổng số β -caroten của *D. salina*. Đồng phân 9-cis là một chất chuyển hóa có giá trị cao được chứng minh là có khả năng chống oxy hóa tốt hơn đồng phân all-trans (Borowitzka & Borowitzka, 1988).

Tế bào *D. salina* không có thành tế bào cứng, tế bào chỉ được bao bọc bởi một màng sinh chất mỏng có tính đàn hồi có khả năng biến đổi phù hợp với nhiều độ muối khác nhau của môi trường. Ở môi trường có độ muối cao, *D. Salina* có những biến đổi thẩm thấu bao gồm thay đổi thể tích tế bào, nồng độ ion nội bào, nồng độ glycerol nội bào và biểu hiện một số gen cảm ứng muối (Vo et al., 2017). Ảnh hưởng của nồng độ muối đến hàm lượng lipid của tế bào *Dunaliella* cũng đã được thử nghiệm, tăng độ muối ở thời điểm tăng trưởng mạnh có thể làm tăng hàm lượng lipid lên 70% (Hosseini Tafreshi & Shariati, 2009). Theo Ahmed và cộng sự (2017), hàm lượng carotenoid (5,16 mg/L) và lipid (248,33 mg/L) của vi tảo *D. salina* đạt giá trị cao nhất ở độ muối 2M NaCl (Ahmed et al., 2017). Nghiên cứu khác của Rad (2011) về ảnh hưởng của độ muối (1-3M) đến sự tăng trưởng và sản xuất β -caroten của vi tảo *Dunaliella* sp.. Kết quả cho thấy, số lượng tế bào và hàm lượng β -caroten của *Dunaliella* sp. dao động trong khoảng từ $0,53-2,21 \times 10^6$ tế bào/mL và 0,2 - 11,4 pg/tế bào, số lượng tế bào và hàm lượng β -caroten cao nhất thu được ở nồng độ NaCl 1M và 3M, lần lượt là $1,68 \times 10^6$ tế bào/mL và 8,94 pg/tế bào (Rad, Aksoz, & Hejazi, 2011).

Như vậy, vi tảo *D. bardawil* tích lũy carotenoid và lipid phụ thuộc vào nồng độ muối trong môi trường nuôi cấy. Nghiên cứu này nhằm đánh giá khả năng tích lũy carotenoid và lipid của vi tảo *D. bardawil* DCCBC 15 nuôi cấy ở các điều kiện muối cao.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. *Chủng vi tảo Dunaliella bardawil DCCBC 15 và điều kiện nuôi cấy*

Chủng vi tảo *D. bardawil* DCCBC 15 được cung cấp bởi Juergen E.W. Polle, Phòng Sinh học, Trường Đại học Brooklyn, New York, Hoa Kỳ. Nuôi cấy trên môi trường MD4 1,5M gồm các thành phần dinh dưỡng: NPK 0,1 g/L, MgSO₄ 1,86 g/L, EDTA 8,76 mg/L, FeCl₃ 0,49 mg/L, MnCl₂ 1,89 mg/L, NaHCO₃ 3,15 g/L, pH = 7,5. Cường độ ánh sáng 90 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$, chu kỳ sáng tối 12:12 giờ, nhiệt độ nuôi cấy $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ (Tran, Doan, Louime, Giordano, & Portilla, 2014).

2.2. *Các phương pháp nghiên cứu*

2.2.1. *Xác định mật độ tế bào*

Mật độ tế bào tảo được đếm trực tiếp bằng buồng đếm hồng cầu sau 21 ngày ức chế. Một trăm μL mẫu tảo được lấy và cố định bằng lugol (5% Iod và 10% muối KI). Buồng đếm hồng cầu Neubauer có độ sâu 0,1 mm và diện tích ô vuông 1 mm². Mật độ tế bào trong mL được tính theo công thức : $D = \frac{n}{i} \times 10^4 \times \text{hệ số pha loãng}$ (Guillard & Sieracki, 2005).

Trong đó:

n: Tổng số tế bào đếm được

i: Thể tích đếm

D: Mật độ tế bào (tế bào/mL).

2.2.2. Xác định hàm lượng carotenoid tổng

Lấy 1 mL dịch nuôi cấy, li tâm 10000 vòng trong 5 phút, phần tảo bên dưới được li trích với 3 mL ethanol: hexan (2:1 v/v), lắc mạnh. Thêm vào 2 mL H₂O và 4 mL hexan, lắc mạnh. Hỗn hợp li trích này được li tâm 10.000 vòng trong 5 phút. Lớp sắc tố có hexan bên trên được đem đo mật độ quang ở các bước sóng 450 nm, 662 nm và 645 nm. Hàm lượng carotenoid tổng được xác định theo công thức: Carotenoid (µg/mL) = A₄₅₀ x 25,2 (Prieto, Cañavate, & García-González, 2011; Shaish, Ben-Amotz, & Avron, 1992).

Tính hàm lượng carotenoid/tế bào (pg/tb) dựa trên hàm lượng carotenoid/mL và mật độ tế bào/mL.

Hàm lượng diệp lục tố a và b được xác định theo (Lichtenthaler & Wellburn, 1983):

$$\text{Diệp lục tố a (µg/mL)} = 11,75 (A_{662}) - 2,35 (A_{645})$$

$$\text{Diệp lục tố b (µg/mL)} = 18,61 (A_{645}) - 3,96 (A_{662})$$

$$\text{Diệp lục tố tổng (µg/mL)} = \text{diệp lục tố a} + \text{diệp lục tố b}$$

Trong đó: A₆₄₅ là độ hấp thụ ở bước sóng 645, A₆₆₂ là độ hấp thụ ở bước sóng 662.

Tính tỉ lệ hàm lượng carotenoid/diệp lục tố (Car/dlt) dựa trên hàm lượng carotenoid/tb và diệp lục tố/tb.

2.2.3. Xác định hàm lượng lipid tổng

Pha thuốc thử Phosphovanillin: Hòa tan 0,06 g vanillin trong 2 mL ethanol nguyên chất, thêm 8 mL nước cất và lắc kĩ. Thêm 50 mL dung dịch acid phosphoric đậm đặc vào hỗn hợp trên và bảo quản trong tối cho quá trình phân tích (Mishra et al., 2014; Park, Jeong, Yoon, & Moon, 2016).

Xác định hàm lượng lipid: li tâm 1 mL dịch nuôi cấy ở 10.000 vòng, 40°C, 10 phút; phần lắng tế bào được li trích với 2 mL acid sulfuric đậm đặc, sau đó đun trên bếp cách thủy 100°C trong 10 phút, làm lạnh trong bể nước đá. Bổ sung 5 mL thuốc thử Phosphovanillin, hỗn hợp được ủ ở 37°C và lắc mẫu. Đo mẫu ở bước sóng 530 nm (Mishra et al., 2014; Park et al., 2016).

Đường chuẩn lipid: Dầu cải thương mại (hiệu Tường An) được pha trong chloroform (nồng độ 1 mg/mL), nồng độ lipid chuẩn (10-150 µg) được thực hiện trong các ống nghiệm có nắp. Ủ các ống nghiệm ở nhiệt độ 90°C, 10 phút để bay hơi chloroform. Thêm 2 mL acid sulfuric đậm đặc, sau đó đun trên bếp cách thủy 100°C trong 10 phút, làm lạnh trong bể nước đá. Bổ sung 5 mL thuốc thử Phosphovanillin, hỗn hợp được ủ ở 37°C và lắc mẫu liên tục. Đo mẫu ở bước sóng 530 nm. Công thức đường chuẩn lipid: $y = 0,005x - 0,0531$ ($R^2 = 0,9929$).

2.3. Thiết kế thí nghiệm

Dunaliella bardawil DCCBC 15 được nuôi cấy trên môi trường MD4 1,5M NaCl gồm 2 giai đoạn:

Giai đoạn nuôi tăng trưởng: *D. bardawil* DCCBC 15 được nuôi trong điều kiện ánh sáng trắng 90 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$. Mật độ tăng trưởng tế bào vi tảo ban đầu khoảng 0,15 x 10⁶ tế bào/mL.

Giai đoạn nuôi ức chế: Sau 12 ngày nuôi cấy tăng trưởng, *D. bardawil* DCCBC 15 được chuyển sang 3 điều kiện gồm:

- Cạn kiệt dinh dưỡng (Đối chứng): *D. bardawil* được tiếp tục điều kiện nuôi cấy ban đầu trong môi trường MD4 1,5M NaCl;
- Nồng độ muối cao 3M (3M): Môi trường MD4 1,5M NaCl ban đầu được bổ sung thêm NaCl để đạt độ muối cao 3M;
- Nồng độ muối cao 4,5M (4,5M): Môi trường MD4 1,5M NaCl ban đầu được bổ sung NaCl để đạt độ muối cao 4,5M.

Thu hoạch vi tảo sau 21 ngày nuôi cấy ức chế bằng phương pháp li tâm 10.000 vòng/5phút ở 15°C với 1mL dịch nuôi cấy và lưu trữ ở -20°C. Tiến hành phân tích xác định hàm lượng carotenoid và lipid của *D. bardawil* ở 3 nghiệm thức. Số lần lặp lại của mỗi thí nghiệm được xác định theo công thức: $(r-1).(t-1) \geq 12$. Trong đó: r: số lần lặp lại; t: số nghiệm thức

2.4. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng Microsoft office Excel 2019 và phân tích one way ANOVA bằng phần mềm SPSS 25.0 với sai số ý nghĩa $p < 0,05$. Tất cả các số liệu trong thí nghiệm được trình bày dưới dạng: Trung bình (Mean) \pm Sai số chuẩn (SE).

3. Kết quả và thảo luận

3.1 Hàm lượng carotenoid tổng

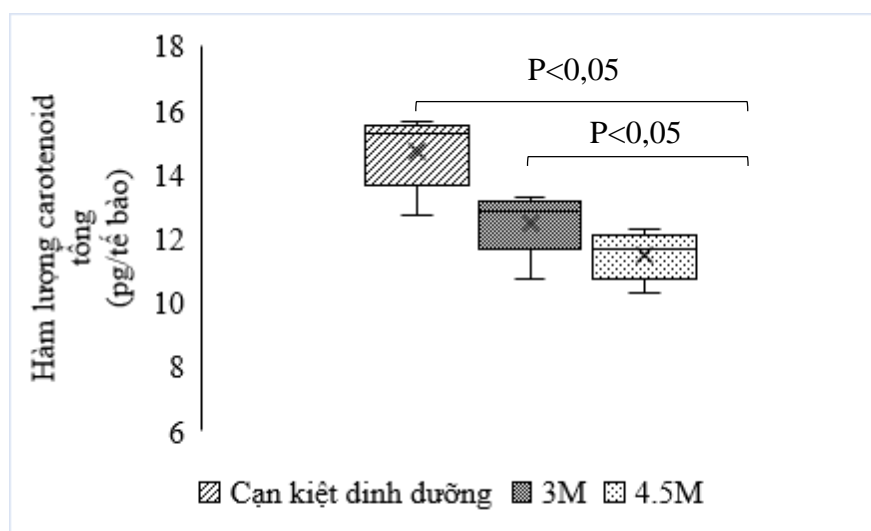
Ở điều kiện ức chế cạn kiệt dinh dưỡng hàm lượng carotenoid (14,890 pg/tb) đạt giá trị cao hơn so với 2 điều kiện ức chế muối 3M (12,710 pg/tb) và 4,5M (11,526pg/tb) ($p < 0,05$) (Hình 1, Bảng 1). Tỷ lệ carotenoid/diệp lục tố (car/dlt) của *D. bardawil* ở điều kiện nuôi cấy cạn kiệt dinh dưỡng (7,966) cao hơn so với điều kiện ức chế muối 3M (7,269) và 4,5M (7,258) ($p < 0,05$) (Hình 2, Bảng 1). Trong đó, ở điều kiện ức chế muối 3M và 4,5M tỷ lệ car/dlt không có sự khác biệt ý nghĩa ($p = 0,997$). Như vậy, ức chế cạn kiệt dinh dưỡng là yếu tố kích thích sự tích lũy carotenoid nhanh và mạnh hơn các điều kiện ức chế độ muối cao.

Diệp lục tố có vai trò quan trọng đối với quá trình quang hợp, được tạo ra nhiều khi tế bào tăng trưởng mạnh (Sims & Gamon, 2002). Khi bị hạn chế tăng trưởng như ở điều kiện môi trường độ muối cao 3M và 4,5M hoặc điều kiện chất dinh dưỡng đa lượng như nitrogen, phosphor, kali cạn kiệt hàm lượng diệp lục tố đều có xu hướng giảm.

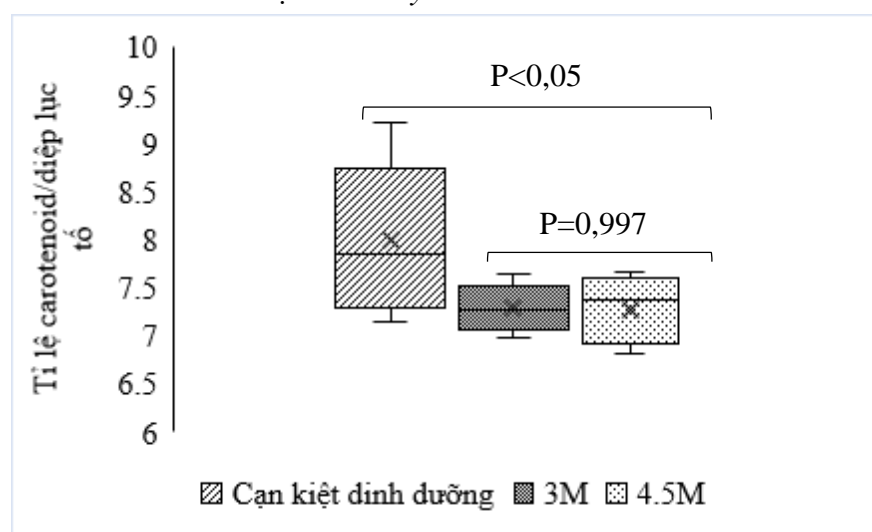
Trong môi trường hạn chế tăng trưởng như độ muối cao, chiếu xạ mạnh, cạn kiệt chất dinh dưỡng sắc tố carotenoid được tạo ra với vai trò bảo vệ tế bào vi tảo *D. bardawil* chống lại điều kiện sống bất lợi (Borowitzka & Borowitzka, 1988). Các hạt lipid có chứa carotenoid không chỉ là bào quan dự trữ đơn thuần mà chúng có thể phối hợp với các bào quan khác để thực hiện chức năng sống (Lichtenthaler & Wellburn, 1983). Khi nồng độ muối trong môi

trường tăng, tế bào *D. salina* xuất hiện nhiều giọt chứa carotenoid ở lục lạp. Lục lạp có sự biến đổi để đáp ứng với nồng độ muối cao và các hạt carotenoid có sự tăng lên về kích thước (Mishra et al., 2014). Sự thích nghi của *D. salina* đối với stress muối có thể biến đổi nhanh chóng nồng độ glycerol nội bào và glycin betain, tiếp đến là đáp ứng dài hạn gồm tổng hợp lipid trung tính và tích lũy nhiều carotenoid. Sự đáp ứng dài hạn đối với độ muối cao bao gồm những thay đổi trong biểu hiện gen thông qua một hay nhiều nhân tố phiên mã chưa được xác định và sự tổng hợp protein de novo. Những sản phẩm từ các gen được cảm ứng bởi độ muối cao gồm các sản phẩm phiên mã và protein liên quan đến sự đồng hóa carbon và sắt cũng như sinh tổng hợp carotenoid (Byrd, Burkholder, & Zimba, 2017). Theo Nguyễn Thị Hải Thanh và cộng sự (2014) hàm lượng β -caroten (pg/tb) của *D. salina* giảm trong các ngày đầu nuôi cấy. Sau đó, hàm lượng β -caroten tăng trở lại, đối với độ muối 1,5 M và 2M thu được hàm lượng carotenoid cao. Tuy nhiên, sau đó hàm lượng β -caroten có xu hướng giảm (còn 11,6%). Với độ muối 5M gây bất lợi cho cả sự tăng trưởng và hợp chất thứ cấp như carotenoid và glycerol. Trong khi đó, hàm lượng β -caroten ở nồng độ 3M và 4M có xu hướng tăng dần. Trong điều kiện độ muối cao, tế bào cần có thời gian để khởi động cơ chế tăng tổng hợp glycerol và tích lũy β -caroten, điều này thể hiện mối liên hệ giữa số ngày sinh trưởng của tảo và mức độ tổng hợp carotenoid. Sau giai đoạn tăng trưởng, ở độ muối cao 3M và 4M hàm lượng β -caroten (pg/tb) lại có xu hướng tăng. Xu hướng này xảy ra do ở nồng độ muối từ 0.5M - 3M là nồng độ thích hợp cho sinh trưởng của tảo, mật độ tế bào tăng lên rất nhanh vào pha suy vong của tảo, số lượng tế bào/L môi trường có xu hướng giảm dần. Trong khi đó tại nồng độ muối cao, do điều kiện sống không thuận lợi, sự hình thành các thể cyst kéo dài thời gian sinh trưởng, tế bào có xu hướng tổng hợp β -caroten thích nghi với điều kiện ánh sáng mạnh và nồng độ muối cao (Maryam Madadkar Haghjou & Shariati, 2007; Maryam M Haghjou, Shariati, & Smirnoff, 2009; Nguyen & Ngo 2014).

Theo Gómez (2003), hàm lượng carotenoid ảnh hưởng bởi thành phần dinh dưỡng trong môi trường, độ muối không có ảnh hưởng rõ ràng đến sự tích tụ β -caroten trên mỗi tế bào vi tảo *D. bardawil* (Gómez, Barriga, Cifuentes, & González, 2003). Trong khi đó, Marin và cộng sự (1988) cho rằng ánh sáng và độ mặn có thể là một trong những chiến lược tốt nhất để đạt được sản lượng β -caroten tối ưu ở *D. salina* (Marín, Morales, Lodeiros, & Tamigneaux, 1998). Một nghiên cứu khác cũng có kết quả hàm lượng carotenoid và lipid của *D. salina* ở điều kiện stress giảm thẩm thấu (0,5M) và cạn kiệt dinh dưỡng cao hơn so với điều kiện tăng thẩm thấu (3,5M) (Vo et al., 2017). Trong thí nghiệm này, sau 12 ngày các điều kiện nuôi cấy có sự thay đổi đột ngột độ muối từ 1,5M lên 3M và 4,5M; dưới áp lực của độ muối cao dẫn đến sự thay đổi đáng kể đến khả năng tích lũy carotenoid của *D. bardawil*.



Hình 1. Hàm lượng carotenoid của *D. bardawil* DCCBC 15 ở các điều kiện nuôi cấy ức chế khác nhau

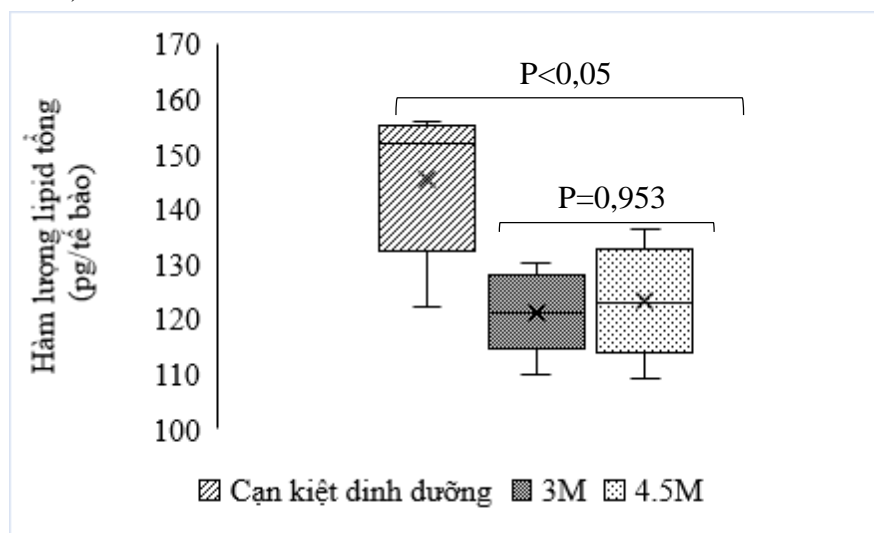


Hình 2. Tỷ lệ carotenoid/diệp lục tố của *D. bardawil* DCCBC 15 ở các điều kiện nuôi cấy ức chế khác nhau

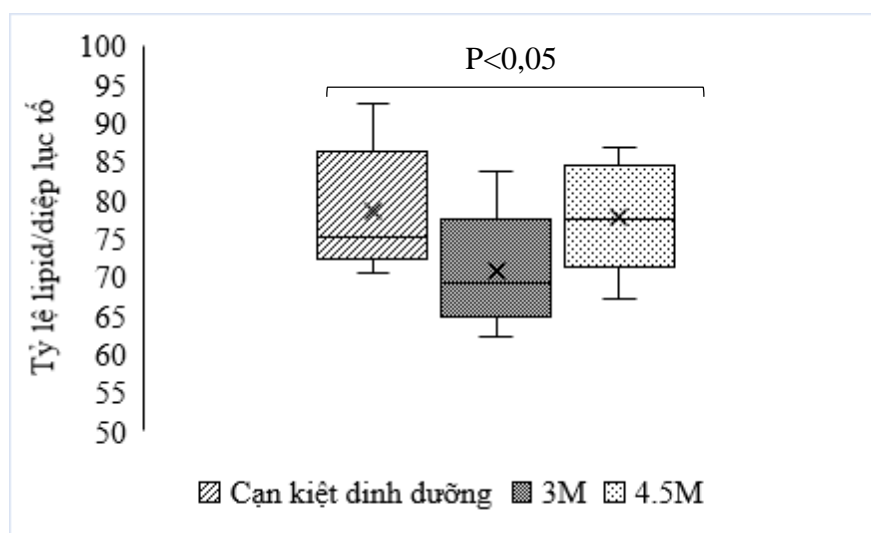
3.2 Hàm lượng lipid tổng

Hàm lượng lipid của vi tảo *D. bardawil* DCCBC 15 ở điều kiện ức chế cạn kiệt dinh dưỡng (145,946 pg/tb) đạt giá trị cao hơn so với điều kiện ức chế nồng độ muối cao 3M (122,038 pg/tb) và 4,5M (122,963 pg/tb) ($p < 0,05$) (Hình 3, Bảng 1). Tỷ lệ lipid/diệp lục tố (lipid/dlt) của *D. bardawil* nuôi cấy ở điều kiện ức chế cạn kiệt dinh dưỡng (77,964) và ức chế muối 4,5M (77,612) không có sự khác biệt ý nghĩa ($p = 0,986$) cao hơn so với điều kiện còn lại ($p < 0,05$) (hình 3.4, bảng 3.1). Như vậy, tương tự như sự tích lũy carotenoid, sự tích lũy lipid ở điều kiện nuôi cấy cạn kiệt dinh dưỡng gây ra sự tổng hợp lipid cao hơn các điều kiện ức chế nồng độ muối cao 3M và 4,5M.

Độ muối của môi trường có ảnh hưởng đến sinh lí và sinh hóa của vi tảo *Dunaliella* sp., khi độ muối của môi trường thấp hoặc cao hơn giá trị tối ưu cho sự tăng trưởng sẽ thúc đẩy tế bào vi tảo *Dunaliella* kích hoạt hệ thống bảo vệ và dự trữ. Theo Ben-Moussa và cộng sự (2016) cho rằng đối với *Dunaliella* nuôi cấy ở độ muối thấp hơn giá trị tối ưu cho tăng trưởng sẽ giúp vi tảo tích lũy nhiều lipid và độ muối 3M được xem là tối ưu đối với sự tăng trưởng của *Dunaliella* sp. (BenMoussa-Dahmen, Chtourou, Rezgui, Sayadi, & Dhouib, 2016). Theo Farhat và cộng sự (2011), *Dunaliella salina* nuôi cấy hơn 25 ngày với nồng độ NaCl (0,6-4,5 M). Kết quả cho thấy, sự phát triển tối ưu đạt được ở độ muối 1,5-3,0M NaCl. Có thể ở điều kiện ức chế 3M NaCl tế bào vi tảo phân chia nhiều nhất và tạo ra ít sản phẩm dự trữ như lipid, còn ở độ muối 4,5M vượt quá nồng độ tối ưu cho sự tăng trưởng, tế bào sẽ tích lũy lipid nhưng hàm lượng trên mỗi tế bào không đáng kể. Khi độ muối ở mức 1,5M thấp hơn mức tối ưu cho sự phát triển của vi tảo, sẽ tích lũy lượng lớn lipid (Farhat et al., 2011). Ngoài ra, sự cạn kiệt dinh dưỡng đa lượng như nitrogen, phosphor cũng thúc đẩy tế bào vi tảo tích lũy nhiều lipid hơn. Cạn kiệt nitrogen được xem là một trong những chiến lược hiệu quả làm tăng khả năng tích lũy hàm lượng lipid lên 90%. Stress oxy hóa là tác nhân đơn lẻ có thể gây ra sự tích tụ lipid. Sự tích tụ lipid trong điều kiện suy giảm nitrogen xảy ra qua trung gian stress oxy hóa. Sự gia tăng sản xuất gốc tự do (ROS) và quá trình peroxy hóa lipid đều được quan sát thấy trong các điều kiện giới hạn nitrogen, cùng với sự tăng tích tụ lipid đặc biệt là ở pha cân bằng (Yilancioglu, Cokol, Pastirmaci, Erman, & Cetiner, 2014).



Hình 3. Hàm lượng lipid của *D. bardawil* DCCBC 15 ở các điều kiện nuôi cấy ức chế khác nhau



Hình 4. Tỷ lệ lipid/diệp lục tố của *D. bardawil* ở các điều kiện nuôi cấy ức chế khác nhau

Bảng 1. Hàm lượng carotenoid, tỉ lệ carotenoid/diệp lục tố, hàm lượng lipid và tỉ lệ lipid/diệp lục tố của *D. bardawil* ở các điều kiện nuôi cấy ức chế khác nhau

Nghiệm thức	Hàm lượng carotenoid (pg/tb)	Tỉ lệ Car/dlt	Hàm lượng lipid (pg/tb)	Tỉ lệ lipid/dlt
Cạn kiệt dinh dưỡng	14,890±0,216 ^c	7,966±0,163 ^b	145,946±3,046 ^b	77,964±1,720 ^b
3M	12,710±0,146 ^b	7,269±0,048 ^a	122,038±1,256 ^a	71,376±1,164 ^a
4,5M	11,526±0,132 ^a	7,258±0,067 ^a	122,963±1,947 ^a	77,612±1,358 ^b

4. Kết luận

Độ muối cao 3M và 4,5M có ảnh hưởng đến khả năng tích lũy carotenoid và lipid của vi tảo *Dunaliella bardawil* DCCBC15. Tuy nhiên, hàm lượng carotenoid và lipid của *D. bardawil* nuôi cấy ở điều kiện cạn kiệt dinh dưỡng (14,890 pg/tb và 145,946 pg/tb) cao hơn các điều kiện ức chế độ muối cao 3M và 4,5M. Điều kiện nuôi cấy cạn kiệt dinh dưỡng là một chiến lược nuôi cấy *D. bardawil* hiệu quả để thu nhận sinh khối có hàm lượng carotenoid và lipid cao.

❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmed, R. A., He, M., Aftab, R. A., Zheng, S., Nagi, M., Bakri, R., & Wang, C. (2017). Bioenergy application of *Dunaliella salina* SA 134 grown at various salinity levels for lipid production. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.
- Ben-Amotz, A., Katz, A., & Avron, M. (1982). Accumulation of β -carotene in halotolerant alga: purification and characterization of β -carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae) 1. *Journal of Phycology*, 18(4), 529-537.
- BenMoussa-Dahmen, I., Chtourou, H., Rezgoui, F., Sayadi, S., & Dhouib, A. (2016). Salinity stress increases lipid, secondary metabolites and enzyme activity in *Amphora subtropica* and *Dunaliella* sp. for biodiesel production. *Bioresource technology*, 218, 816-825.
- Borowitzka, M., & Borowitzka, L. (1988). Limits to growth and carotenogenesis in laboratory and large-scale outdoor cultures of *Dunaliella salina*. In: Elsevier Applied Science.
- Byrd, S. M., Burkholder, J. M., & Zimba, P. V. (2017). Environmental stressors and lipid production by *Dunaliella* spp. I. Salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 487, 18-32.
- Chavoshi, Z. Z., & Shariati, M. (2019). Lipid production in *Dunaliella bardawil* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Brazilian Journal of Oceanography*, 67.
- Farhat, N., Rabhi, M., Falleh, H., Jouini, J., Abdelly, C., & Smaoui, A. (2011). Optimization of salt concentrations for a higher carotenoid production in *dunaliella salina* (chlorophyceae) 1. *Journal of Phycology*, 47(5), 1072-1077.
- Gómez, P. I., Barriga, A., Cifuentes, A. S., & González, M. A. (2003). Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC 30861) Chlorophyta. *Biological Research*, 36(2), 185-192.
- Goswami, R. K., Agrawal, K., & Verma, P. (2021). Microalgae *Dunaliella* as biofuel feedstock and β -carotene production: An influential step towards environmental sustainability. *Energy Conversion and Management: X*, 100154.
- Guillard, R. R., & Sieracki, M. S. (2005). Counting cells in cultures with the light microscope. *Algal culturing techniques*, 239-252.
- Haghjou, M. M., & Shariati, M. (2007). Photosynthesis and respiration under low temperature stress in two *Dunaliella* strains. *World Applied Sciences Journal*, 2(4), 276-282.
- Haghjou, M. M., Shariati, M., & Smirnov, N. (2009). The effect of acute high light and low temperature stresses on the ascorbate–glutathione cycle and superoxide dismutase activity in two *Dunaliella salina* strains. *Physiologia Plantarum*, 135(3), 272-280.
- Hosseini Tafreshi, A., & Shariati, M. (2009). *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of applied microbiology*, 107(1), 14-35.
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. In: Portland Press Ltd.
- Marín, N., Morales, F., Lodeiros, C., & Tamigneaux, E. (1998). Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities. *Journal of applied phycology*, 10(4), 405-411.

- Mishra, S. K., Suh, W. I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M. S., & Yang, J.-W. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource technology*, *155*, 330-333.
- Nguyen, T. H. T., & Ngo, D. N.. (2014). Phân lập vi tảo *dunaliella salina* NT6 tại Khánh Hòa và nghiên cứu các điều kiện sinh trưởng và tổng hợp β -caroten của tảo. [Isolation microalgae *Dunaliella salina* NT6 in Khanh Hoa province and studying factors affecting the growth and β -carotene production] *Can Tho University Journal of Science*, *1*, 218-228.
- Paniagua-Michel, J., Olmos-Soto, J., & Ruiz, M. A. (2012). Pathways of carotenoid biosynthesis in bacteria and microalgae. *Microbial carotenoids from bacteria and microalgae*, 1-12.
- Park, J., Jeong, H. J., Yoon, E. Y., & Moon, S. J. (2016). Easy and rapid quantification of lipid contents of marine dinoflagellates using the sulpho-phospho-vanillin method. *Algae*, *31*(4), 391-401.
- Prieto, A., Cañavate, J. P., & García-González, M. (2011). Assessment of carotenoid production by *Dunaliella salina* in different culture systems and operation regimes. *Journal of biotechnology*, *151*(2), 180-185.
- Rad, F. A., Aksoz, N., & Hejazi, M. A. (2011). Effect of salinity on cell growth and β -carotene production in *Dunaliella* sp. isolates from Urmia Lake in northwest of Iran. *African Journal of Biotechnology*, *10*(12), 2282-2289.
- Ramos, A. A., Polle, J., Tran, D., Cushman, J. C., Jin, E.-S., & Varela, J. C. (2011). The unicellular green alga *Dunaliella salina* Teod. as a model for abiotic stress tolerance: genetic advances and future perspectives. *Algae*, *26*(1), 3-20.
- Ravishankar, G. A., & Rao, A. R. (2019). *Handbook of Algal Technologies and Phytochemicals: Two Volume Set*: CRC Press.
- Shaish, A., Ben-Amotz, A., & Avron, M. (1992). [41] Biosynthesis of β -carotene in *Dunaliella*. In *Methods in enzymology* (Vol. 213, pp. 439-444): Elsevier.
- Shete, V., & Quadro, L. (2013). Mammalian metabolism of β -carotene: gaps in knowledge. *Nutrients*, *5*(12), 4849-4868.
- Sims, D. A., & Gamon, J. A. (2002). Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote sensing of environment*, *81*(2-3), 337-354.
- Tran, D., Doan, N., Louime, C., Giordano, M., & Portilla, S. (2014). Growth, antioxidant capacity and total carotene of *Dunaliella salina* DCCBC15 in a low cost enriched natural seawater medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*(1), 317-322.
- Vo, T., Mai, T., Vu, H., Van, D., Dao, H., Tran, P., . . . Nguyen, N. C. (2017). Effect of osmotic stress and nutrient starvation on the growth, carotenoid and lipid accumulation in *Dunaliella salina* A9. *A9, Research in Plant Sciences*, *5*(1), 1-8.
- Yilancioglu, K., Cokol, M., Pastirmaci, I., Erman, B., & Cetiner, S. (2014). Oxidative stress is a mediator for increased lipid accumulation in a newly isolated *Dunaliella salina* strain. *PLoS one*, *9*(3), e91957.

ACCUMULATION OF CAROTENOID AND LIPID IN MICROALGAE
DUNALIELLA BARDAWIL DCCBC 15 CULTIVATED
UNDER HIGH SALINITY CONDITIONS

Vo Hong Trung*, Nguyen Huynh Nhi, Nguyen Thi Hong Phuc

Nguyen Tat Thanh University, Vietnam

*Corresponding author: Vo Hong Trung – Email: vhrung@ntt.edu.vn

Received: October 17, 2022; Revised: April 19, 2023; Accepted: April 22, 2023

ABSTRACT

The salt-tolerant unicellular green algae *Dunaliella bardawil* (*D. salina* var *bardawil*) is a natural source of β -carotene with the contents of up to 14% of dry weight under adverse environmental conditions, such as nutrient deficiency, high salinity, and high irradiance. This study aimed to assess the effect of salinity stress on the production of carotenoids and lipids under nutrient deficiency and the salinity of 3M and 4,5M in low-cost enriched natural seawater medium. The results showed that the carotenoids contents of the *D. bardawil* under the nutrient starvation (14,890 pg/tb) and the car/chl ratio (7,966) were higher compared with a high salinity of 3M (12,710 pg/tb và 7,269) and 4,5M condition (11,526 pg/tb và 7,258) ($p < 0,05$). Similarly, lipids accumulation by *D. bardawil* under the nutrient starvation (145,946 pg/tb) and lipid/chl ratio (77,964) were also higher compared with a high salinity of 3M (122,038 pg/tb và 71,376) and 4,5M condition (122,963 pg/tb và 77,612). Thus, nutrient starvation is one of the strategies for the cultivation of *D. bardawil* to obtain high carotenoids and lipids contents from biomass.

Keywords: carotenoid; *Dunaliella bardawil*; lipid; nutrient starvation; salinity stress